赖氨酸对奶牛乳腺上皮细胞内乳脂肪合成相关基因和蛋白表达的影响

陈　璐　赵艳丽　郭晓宇　史彬林　闫素梅*

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特　010018）

摘　要：本试验旨在研究赖氨酸（Lys）对奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）内乳脂肪合成相关基因和蛋白表达的影响，探讨 Lys 影响乳脂肪合成的机理。将第 3 代 BMECs 随机分为 6 组，每组 6 个重复,每个重复 1 个培养孔。各组培养基中 Lys 的浓度分别为 0.5（基础培养基，对照）、1.0、2.0、4.0、8.0 和 16.0 mmol/L，37 ℃、5% CO_2 培养 48 h 后测定 BMECs 甘油三酯（TAG）含量、乳脂肪合成相关基因和蛋白的表达量。结果表明：BMECs 内 TAG 含量（*P*=0.013）以及脂肪酸结合蛋白 3（*FABP*3，*P*=0.001）、脂蛋白脂酶（*LPL*，*P*=0.096）、脂肪酸合成酶（*FASN*，*P*=0.003）、乙酰甘油磷酸脂酰转移酶 6（*AGPAT*6，*P*=0.038）和甘油-3-磷酸酰基转移酶（*GPAM*，*P*=0.022）基因表达量对 Lys 呈显著或趋于显著的浓度依赖效应。*FABP*3 基因表达量以 2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组和 *LPL* 基因表达量以 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组显著高于 0.5 mmol/L 组（*P*<0.05）；*FASN* 基因表达量以 2.0 mmol/L 组最高，显著高于 16.0 mmol/L 组（*P*<0.05）；硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（*SCD*1）基因表达量以 2.0、4.0 mmol/L 组显著高于其他组（*P*<0.05）；磷脂酸磷酸酯酶 1（*LPIN*1）、嗜乳脂蛋白亚家族 1 成员 1（*BTN*1*A*1）和黄嘌呤脱氢酶（*XDH*）基因表达量均以 1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L 组显著高于 0.5 mmol/L 组（*P*<0.05）；过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（*PPARγ*）基因及蛋白表达量均以 2.0、4.0 mmol/L 组显著高于 0.5 和 8.0、16.0 mmol/L 组（*P*<0.05）；固醇调节元件结合蛋白 1（*SREBP*1）基因表达量以 1.0、2.0、4.0 mmol/L 组显著高于其他组（*P*<0.05），蛋白表达量以 1.0 组显著高于其他组（*P*<0.05）。但高浓度 Lys 抑制 *AGPAT*6 和 *GPAM* 的基因表达，*AGPAT*6 基因表达量以 2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组显著低于 0.5、1.0 mmol/L 组（*P*<0.05），*GPAM* 基因表达量以 16.0 mmol/L 组显著低于 0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L 组（*P*<0.05）。可见，Lys 对 BMECs 的乳脂肪合成具有显著的促进效果，但高浓度

收稿日期：2017-02-24

基金项目：国家奶业“973 计划”项目（2011CB1008003）

作者简介：陈　璐（1990-），女，山西省襄汾人，硕士研究生，从事奶牛营养研究。E-mail：1510560671@qq.com

*通信作者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail：　yansmimau@163.com

的 Lys 抑制了乳脂肪合成相关基因的表达。本试验条件下，培养基中 Lys 适宜浓度为 2.0~4.0 mmol/L。

关键词：奶牛；乳腺上皮细胞；赖氨酸；乳脂肪

中图分类号：S823

乳脂肪是牛奶的主要成分，是评价牛奶质量的重要指标之一。氨基酸（AA）是乳蛋白合成的重要前体物，但 AA 在影响乳蛋白合成的同时，也影响着乳脂肪合成与组成[1]。因此，深入研究 AA 对乳脂肪合成的影响及机理，对调控乳腺内乳成分的合成和改善乳品质具有重要意义。赖氨酸（Lys）是动物的必需氨基酸，Giallongo 等[2]向奶牛灌注过瘤胃赖氨酸（RPLys）后发现，Lys 在促进乳蛋白合成的同时，对乳脂肪的合成具有促进效果。Xu 等[3]研究发现，向泌乳母猪饲喂 Lys 和缬氨酸（Val）后，适宜的 Lys 和 Val 比例能够使母猪背部脂肪损失降到最低，说明 Lys 和 Val 能够影响乳脂肪的合成。韩慧娜[4]研究发现，秸秆饲粮条件下奶牛阴外动脉灌注 AA 能促进乳腺内短链脂肪酸的摄取。可见，Lys 在一定程度上影响了乳脂肪的合成，然而国内外的研究报道多集中在向奶牛瘤胃内及阴外动脉灌注 Lys 影响乳蛋白和乳脂肪合成的方面，但以奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）为模型，研究不同浓度 Lys 对乳脂肪合成相关基因和蛋白表达的影响的国内外报道较少，此方面机理有必要继续进行研究和探索。鉴于此，本研究以 BMECs 为模型，研究不同浓度 Lys 对乳脂肪合成相关基因和蛋白表达的影响，为进一步探讨 Lys 对 BMECs 内乳脂肪合成的影响机理提供理论基础，为调控奶牛 Lys 营养水平，提高生产性能提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器

Ⅱ型胶原酶、DMEM/F12 培养基、胰岛素转铁蛋白硒钠、胎牛血清（FBS）、0.25%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸（EDTA）购自 Gibco 公司；Lys（L8662）、氢化可的松、表皮生长因子、催乳素、油红 O、琼脂糖和兔抗过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）抗体购自 Sigma 公司（AV32880）；两性霉素购自 Amresco 公司；细胞培养用双抗购自 Corning 公司；磷酸盐缓冲液（PBS）和 Tris 缓冲液（TBS）购自 HyClone 公司；RNAiso PLUS、PrimeScript RT Master Mix 和 SYBR Premix ExTaq™ Ⅱ购自 TaKaRa 公司；放射免疫沉淀测定（RIPA）裂解液、2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠（BCA）蛋白质浓度试剂盒、Western 一抗稀释液、Western

二抗稀释液、十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）电泳液、Western 转膜液、ECL 化学超敏显色液购自北京碧云天公司；鼠抗固醇调节元件结合蛋白 1（SREBP1）抗体购自 Abcam 公司（ab3259）；兔抗磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）抗体购自 Proteintech 公司（10494-1-AP）；辣根过氧化物酶（HRP）标记山羊抗兔二抗购自 KPL 公司（04-15-06）；HRP 标记山羊抗鼠二抗购自天津三箭生物技术有限公司（LK2003）。

主要仪器包括：二氧化碳恒温培养（Forma-311，Thermo 公司）；生物安全柜（MSC-ADVANTAGE，Thermo 公司）；倒置显微镜（Olympuse 公司）；全自动酶标仪（Synergy H4 BioTek，BioTek 公司）；细胞计数仪（Cytorecon，GE 公司）；荧光定量 PCR 仪（ABI-7500，ABI 公司）；蛋白质电泳仪、蛋白质转膜仪、蛋白质成像系统（BIO-RAD 公司）。

1.2 原代 BMECs 体外培养

BMECs 用胶原酶消化法获得。在内蒙古呼和浩特市北亚清真屠宰场选取 3~5 岁经产的健康泌乳中期的高产荷斯坦奶牛乳腺组织。去除组织表层，于深层取约 1 cm^3 的组织块放入 4 ℃预冷的 3×双抗 PBS 中。随后在超净台内分别用 3×PBS、75%酒精和 1×PBS 清洗。再去除组织块的表层，选腺泡丰富的组织剪成糊状。加入等体积 0.5%的 II 型胶原酶溶液，37 ℃和 5% CO_2 条件下消化 1 h。之后用 80 目滤网过滤，收集细胞滤液，179×g 离心 5 min，弃上清；PBS 冲洗细胞，179×g 离心 3 min，重复冲洗 2 次。加入完全培养基，吹打均匀后接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中，在 37 ℃和 5% CO_2 条件下培养。当原代细胞贴壁率达到 80%~90%后用 0.25%胰蛋白酶/EDTA 对细胞进行纯化和传代[5]。

1.3 试验设计

试验用第 3 代的 BMECs，按照试验要求的细胞密度接种于不同的细胞培养板上，在 37 ℃和 5% CO_2 条件下培养 24 h。采用单因子随机试验设计，试验中使用的 DMEM/F12 培养基中 Lys 的浓度为 0.5 mmol/L，参考李喜艳[6]和高海娜[7]的研究结果并通过噻唑蓝（MTT）法测定细胞的增殖率确定 Lys 的浓度，各组 Lys 的浓度分别为 0.5（基础培养基，对照）、1.0、2.0、4.0、8.0 和 16.0 mmol/L，每组 6 个重复,每个重复 1 个培养孔。细胞贴壁率达到 80%~90%时，换为饥饿培养基，培养 12 h 后按照试验设计要求换成不同浓度 Lys 的培养基，37 ℃和 5% CO_2 培养 48 h。

1.4 测试指标与方法

1.4.1 细胞活力与 TAG 的含量

细胞活力采用 MTT 法检测，以 490 nm 吸光度值（$OD_{490\ nm}$）计算细胞相对增殖率（RGR）表示，公式如下：

$$RGR(\%)=（试验组\ OD_{490\ nm}/对照组\ OD_{490\ nm}）\times 100。$$

TAG 含量参考 Ramírez-Zacarías 等[8]的方法测定，将细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔培养板上，按试验设计培养结束后，弃掉培养基，PBS 清洗 2 遍，每孔加入 4%多聚甲醛溶液 0.2 mL 固定细胞 1 h，PBS 清洗 2 遍，用 0.5 mL 油红 O 工作液避光浸染 2 h。用 PBS 清洗 3 遍，晾干培养板后，加入 0.3 mL 异丙醇萃取 30 min，用全自动酶标仪测定波长为 510 nm 吸光度值（$OD_{510\ nm}$），用以表示 TAG 含量。

1.4.2 BMECs 内乳脂肪合成相关基因的表达

将细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板，按试验设计培养结束后，细胞总 RNA 按照 Trizol 法提取，用酶标仪检测总 RNA 的纯度与浓度，260 和 280 nm 吸光度值比值（$OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$）在 1.8~2.2 表示总 RNA 纯度较好。完整性用 2%琼脂糖凝胶电泳来检测。将总 RNA 反转录成 cDNA，采用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒的方法，反转录体系为 10 μL。基因表达量采用 SYBY Premix Ex Taq™ II 试剂盒的方法进行测定，反应体系为 20 μL。以 *GAPDH* 为管家基因，对乳脂肪合成相关基因[脂肪酸合成酶(*FASN*)、乙酰辅酶 A 羧化酶(*ACACA*)、*PPARγ*、*SREBP*1、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(*SCD*1)、脂肪酸结合蛋白 3(*FABP*3)、脂蛋白脂酶(*LPL*)、乙酰甘油磷酸脂酰转移酶 6(*AGPAT*6)、甘油-3-磷酸酰基转移酶(*GPAM*)、磷脂酸磷酸酯酶 1(*LPIN*1)、嗜乳脂蛋白亚家族 1 成员 1(*BTN*1*A*1)、黄嘌呤脱氢酶(*XDH*)]进行相对定量，引物序列见表 1。实时荧光定量 PCR 的反应程序为：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s；60 ℃退火 34 s，95 ℃延伸 20 s，进行 40 个循环反应；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，95 ℃ 15 s，51 个循环，绘制熔解曲线。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

表 1 乳脂肪合成相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of genes related with milk fat synthesis

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank No.	引物序列 Primer sequences (5′-3′)	长度 Length/bp	参考文献 References
甘油醛脱氢酶 *GAPDH*	XM_001252479	F：GGGTCATCATCTCTGCACCT R：GGTCATAAGTCCCTCCACGA	177	Zhou 等[9]
脂肪酸合成酶 *FASN*	NM_001012669	F:AGGACCTCGTGAAGGCTGTGA R:CCAAGGTCTGAAAGCGAGCTG	85	Qi 等[10]

乙酰辅酶 A 羧化酶	AJ132890	F:CATCTTGTCCGAAACGTCGAT	101	Bionaz 等
ACACA		R:CCCTTCGAACATACACCTCCA		[11]
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1	AY241933	F:TCCTGTTGTTGTGCTTCATCC	101	Bionaz 等
*SCD*1		R:GGCATAACGGAATAAGGTGGC		[11]
脂肪酸结合蛋白 3	DN518905	F:GAACTCGACTCCCAGCTTGAA	102	Bionaz 等
*FABP*3		R:AAGCCTACCACAATCATCGAAG		[11]
脂蛋白脂酶	BC118091	F:*ACACA*GCTGAGGACACTTGCC	101	Bionaz 等
LPL		R:GCCATGGATCACCACAAAGG		[11]
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ	NM_181024	F:CCAAATATCGGTGGGAGTCG	101	Bionaz 等
PPARγ		R:ACAGCGAAGGGCTCACTCTC		[11]
固醇调节元件结合蛋白 1	NM_001113302	F:CTGACGACCGTGAAAACAGA	334	张养东[12]
*SREBP*1		R:AGACGGCAGATTTATTCAACTT		
乙酰甘油磷酸脂酰转移酶 6	DY208485	F.AAGCAAGTTGCCCATCCTCA	101	Bionaz 等
*AGPAT*6		R:AAACTGTGGCTCCAATTTCGA		[11]
甘油-3-磷酸酰基转移酶	NM_001012282.1	F:GCAGGTTTATCCAGTATGGCATT	63	Bionaz 等
GPAM		R:GGACTGATATCTTCCTGATCATCTTG		[11]
磷脂酸磷酸酯酶 1	DV797268	F:TGGCCACCAGAATAAAGCATG	101	自行设计
*LPIN*1		R:GCTGACGCTGGACAACAGG		
嗜乳脂蛋白亚家族 1 成员 1	M35551	F:AGGACGGACTGGGCAATTG	81	Bionaz 等
*BTN*1A1		R:GAACCCATTCTCGGGAGTCAT		[11]
黄嘌呤脱氢酶	BC102076	F:GATCATCCACTTTTCTGCCAATG	100	自行设计
XDH		R:CCTCGTCTTGGTGCTTCCAA		

F：上游引物，R：下游引物。

F: forward primer, R: reverse primer.

1.4.3 BMECs 内 PPARγ 和 SREBP1 的蛋白表达量

采用蛋白免疫印迹的方法测定，以 GAPDH 作为内参蛋白。将细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中，按试验设计培养结束后，弃掉上清，用 PBS 清洗细胞 2 遍，每瓶加入 250 μL 含 0.1%苯甲基磺酰氟（PMSF）的 RIPA 细胞裂解液，4 ℃裂解 5 min 后刮下细胞并收集细胞悬液，4 ℃ 15 455×*g* 离心 10 min，取上清用于检测蛋白的表达量。取适量样品用 BCA 法测定样品的蛋白质浓度，随后分别向 60 μg 的每种样品中添加 5×蛋白质上样缓冲液，按照 4:1 的比例混合，100 ℃加热 5 min 使蛋白质热变性，然后进行电泳，浓缩胶 80 V 电泳 30 min，分离胶 120 V 电泳 120 min。电泳结束后，将分离的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上（100 V，4 ℃，50 min）。转膜后，吐温-TBS（TBST）漂洗 3 次，每次 5 min，室温摇床上封闭 1 h，TBST 漂洗 3 次，每次 5 min。然后将其分别与 250 倍稀释的兔抗 PPARγ 一抗稀释液和 50 倍的鼠抗 SREBP1 一抗稀释液结合，于 4 ℃孵育过夜，取出 PVDF 膜后 TBST 漂洗 3 次，每次 5 min。随后分别与稀释 1 000 倍的山羊抗兔二

抗稀释液和稀释 500 倍的山羊抗鼠二抗稀释液结合，室温摇床孵育 1 h，TBST 漂洗 3 次，每次 10 min。用 ECL 显色法试剂盒进行显色，在蛋白质成像仪上照相分析。图片用 Quantity one 软件进行灰度值分析，PPARγ 和 SREBP1 蛋白表达量采用各组灰度值与 0.5 mmol/L 组灰度值的比值表示。

1.5　数据处理

所有数据通过 Excel 进行整理，采用 SAS 9.0 软件的方差分析程序（ANOVA）进行显著性检验，同时用回归统计程序进行一次线性与二次曲线回归分析，$P<0.05$ 表示组间的差异或回归关系显著，$0.05\leqslant P<0.10$ 表示组间的差异或回归关系趋于显著，$P>0.10$ 表示组间的差异或回归关系不显著。

2　结　果

2.1　Lys 对 BMECs 细胞活力、TAG 含量及乳脂肪合成相关基因表达的影响

由表 2 可知，随着 Lys 浓度的增加，BMECs RGR 呈显著的一次线性下降（$P<0.001$），TAG 含量呈显著的二次曲线升高（$P=0.013$），*FABP*3 和 *LPL* 基因表达量分别呈显著和趋于显著的一次线性增加（$P=0.001$ 和 $P=0.096$），其中，4.0、8.0、16.0 mmol/L 组的 RGR 显著低于 0.5、1.0、2.0 mmol/L 组（$P<0.05$），*FABP*3 基因表达量以 2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组显著高于 0.5、1.0 mmol/L 组（$P<0.05$），*LPL* 基因表达量以 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组显著高于 0.5 mmol/L 组（$P<0.05$）。随着 Lys 浓度的增加，*FASN* 基因表达量呈显著的二次曲线上升（$P=0.003$），最高值出现在 2.0 mmol/L 组，显著高于 16.0 mmol/L 组（$P<0.05$）。2.0、4.0 mmol/L 组的 *SCD*1 基因表达量显著高于其他组（$P<0.05$）。2.0、4.0 mmol/L 组 *PPARγ* 基因表达量显著高于 0.5 和 8.0、16.0 mmol/L 组（$P<0.05$）。1.0、2.0、4.0 mmol/L 组的 *SREBP*1 基因表达量显著高于其他各组（$P<0.05$）。*AGPAT*6 和 *GPAM* 基因表达量随 Lys 的增加均呈显著的一次线性降低（$P=0.038$ 和 $P=0.022$），*AGPAT*6 基因表达量以 2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组显著低于 0.5、1.0 mmol/L 组（$P<0.05$），*GPAM* 基因表达量以 16.0 mmol/L 组显著低于 0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L 组（$P<0.05$）。*LPIN*1 基因表达量以 1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L 组较高，显著高于 0.5 mmol/L 组（$P<0.05$）。*BTN*1*A*1 和 *XDH* 基因表达量也以 1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L 组较高，显著高于其他各组（$P<0.05$）。

表 2　Lys 对 BMECs 细胞活力、TAG 含量和乳脂肪合成相关基因表达量的影响

Table 2 Effects of Lys on cell activity, TAG content and expressions of genes involved in milk fat synthesis in BMECs

项目 Items	Lys 浓度 Lys concentration/(mmol/L)						SEM	*P* 值 *P*-value		
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0		方差分析 ANOVA	一次 Linear	二次 Quadratic
相对增殖率 RGR/%	100.0^{a}	103.9^{a}	102.3^{a}	95.3^{b}	83.7^{c}	69.3^{d}	1.270	<0.001	<0.001	0.004
甘油三酯(以 $OD_{510\ nm}$ 表示) TAG (expressed as $OD_{510\ nm}$)	0.082	0.086	0.087	0.092	0.094	0.087	0.005	0.561	0.538	0.013
脂肪酸结合蛋白 3 *FABP*3	1.00^{e}	1.04^{e}	1.17^{d}	1.44^{c}	1.59^{b}	2.06^{a}	0.041	<0.001	0.001	0.002
脂蛋白脂酶 *LPL*	1.00^{d}	2.26^{c}	2.17^{c}	3.79^{a}	3.22^{b}	3.86^{a}	0.151	<0.001	0.096	0.144
脂肪酸合成酶 *FASN*	1.00^{a}	1.05^{a}	1.08^{a}	1.01^{a}	0.94^{a}	0.57^{b}	0.041	<0.001	0.005	0.003
乙酰辅酶 A 羧化酶 *ACACA*	1.00	1.01	1.02	1.17	1.05	0.98	0.054	0.221	0.710	0.365
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 *SCD*1	1.00^{c}	1.15^{b}	1.30^{a}	1.35^{a}	0.98^{c}	0.89^{c}	0.037	<0.001	0.211	0.420
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ *PPARγ*	1.00^{c}	1.12^{bc}	1.23^{b}	1.55^{a}	0.76^{d}	0.73^{d}	0.053	<0.001	0.206	0.475
固醇调节元件结合蛋白 1 *SREBP*1	1.00^{b}	1.35^{a}	1.36^{a}	1.24^{a}	1.08^{b}	1.01^{b}	0.039	<0.001	0.271	0.578
乙酰甘油磷酸脂酰转移酶 6 *AGPAT*6	1.00^{a}	0.92^{a}	0.68^{b}	0.62^{b}	0.68^{b}	0.43^{c}	0.028	<0.001	0.038	0.124
甘油-3-磷酸酰基转移酶 *GPAM*	1.00^{ab}	1.12^{a}	1.01^{ab}	1.01^{ab}	0.96^{bc}	0.85^{c}	0.038	0.001	0.022	0.109
磷脂酸磷酸酯酶 1 *LPIN*1	1.00^{c}	1.18^{ab}	1.16^{ab}	1.27^{a}	1.18^{ab}	1.05^{bc}	0.048	0.005	0.700	0.301
嗜乳脂蛋白亚家族 1 成员 1 *BTN*1*A*1	1.00^{b}	1.53^{a}	1.68^{a}	1.81^{a}	1.59^{a}	1.02^{b}	0.085	<0.001	0.489	0.206
黄嘌呤脱氢酶 *XDH*	1.00^{c}	1.56^{a}	1.33^{b}	1.51^{ab}	1.44^{ab}	0.99^{c}	0.068	<0.001	0.433	0.303

同行数据肩标相同或无字母表示差异不显著（P>0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）。P<0.05 表示回归关系显著；0.05≤P<0.10 表示回归关系趋于显著；P>0.10 表示回归关系不显著。下表同。

Values in the same row with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (P<0.05). P<0.05 means significant regression, 0.05≤P<0.10 means regression tend to be significant, and P>0.10 means no significant regression. The same as below.

2.2 Lys 对 BMECs PPARγ 和 SREBP1 蛋白表达的影响

由表 3 和图 1 可知，PPARγ 蛋白表达量以 1.0、2.0、4.0 mmol/L 组显著高于其他组（P<0.05），SREBP1 蛋白表达量以 1.0 mmol/L 组显著高于其他各组（P<0.05）。

表 3 Lys 对 BMECs PPARγ 和 SREBP1 蛋白表达的影响

Table 3 Effects of Lys on protein expressions of PPARγ and SREBP1 in BMECs

项目 Items	Lys 浓度 Lys concentration/(mmol/L)						SEM	P 值 P-value		
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0		方差分析 ANOVA	一次 Linear	二次 Quadratic
过氧化物酶体增殖物激活受体γ PPARγ	1.00[d]	1.38[b]	1.36[b]	1.57[a]	1.03[c]	0.98[d]	0.009	<0.001	0.322	0.579
固醇调节元件结合蛋白 1 SREBP1	1.00[c]	1.22[a]	1.18[ab]	1.02[c]	1.06[bc]	1.03[c]	0.047	0.022	0.448	0.769

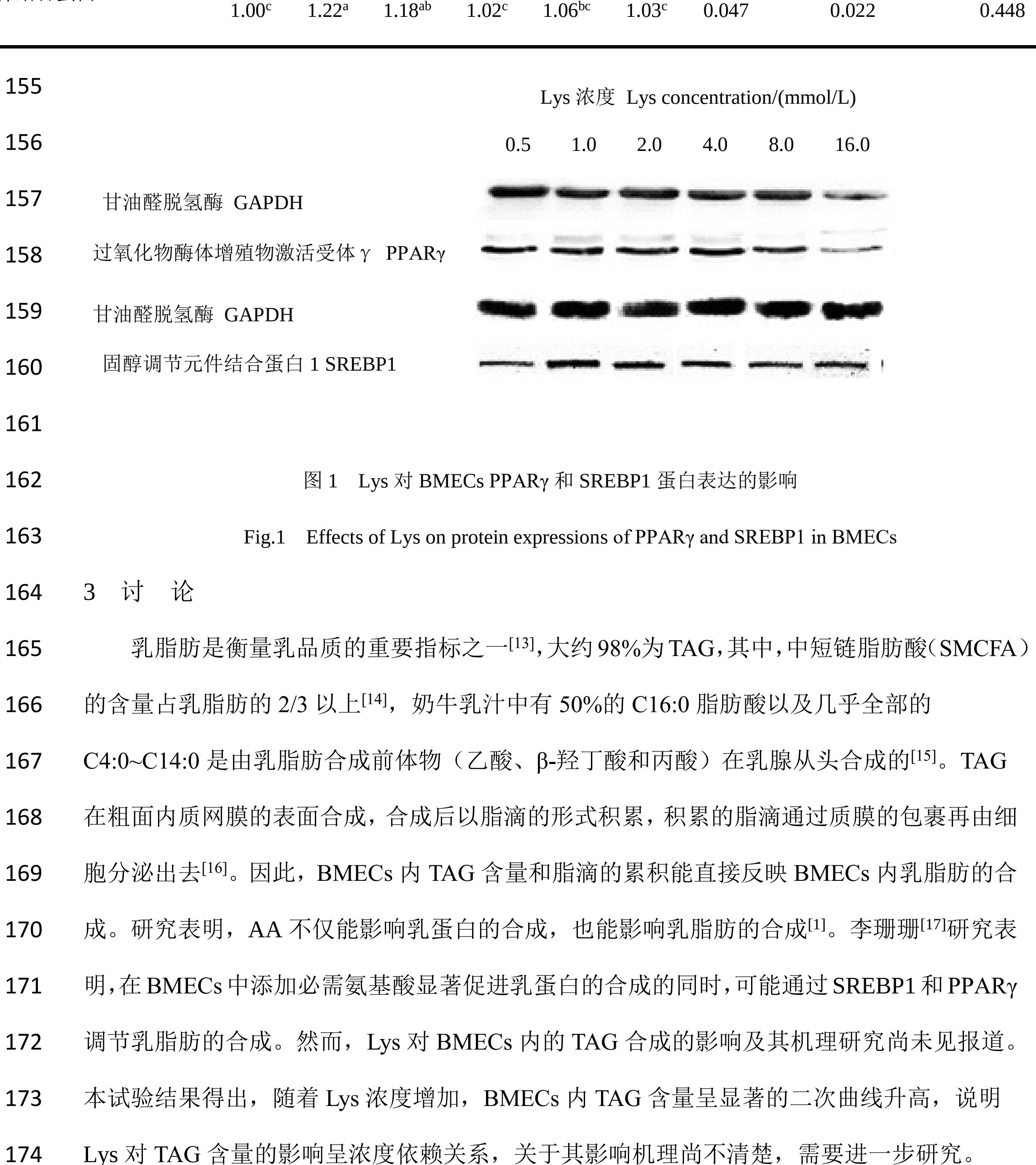


图 1 Lys 对 BMECs PPARγ 和 SREBP1 蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of Lys on protein expressions of PPARγ and SREBP1 in BMECs

3 讨 论

乳脂肪是衡量乳品质的重要指标之一[13]，大约 98%为 TAG，其中，中短链脂肪酸（SMCFA）的含量占乳脂肪的 2/3 以上[14]，奶牛乳汁中有 50%的 C16:0 脂肪酸以及几乎全部的 C4:0~C14:0 是由乳脂肪合成前体物（乙酸、β-羟丁酸和丙酸）在乳腺从头合成的[15]。TAG 在粗面内质网膜的表面合成，合成后以脂滴的形式积累，积累的脂滴通过质膜的包裹再由细胞分泌出去[16]。因此，BMECs 内 TAG 含量和脂滴的累积能直接反映 BMECs 内乳脂肪的合成。研究表明，AA 不仅能影响乳蛋白的合成，也能影响乳脂肪的合成[1]。李珊珊[17]研究表明，在 BMECs 中添加必需氨基酸显著促进乳蛋白的合成的同时，可能通过 SREBP1 和 PPARγ 调节乳脂肪的合成。然而，Lys 对 BMECs 内的 TAG 合成的影响及其机理研究尚未见报道。本试验结果得出，随着 Lys 浓度增加，BMECs 内 TAG 含量呈显著的二次曲线升高，说明 Lys 对 TAG 含量的影响呈浓度依赖关系，关于其影响机理尚不清楚，需要进一步研究。

与细胞内的从头合成、长链脂肪酸（LCFA）的摄取与转运、脂滴的形成等过程有关的基因均会影响 TAG 的合成。哺乳动物组织中摄取和 LCFA 的主要基因是 *LPL* 和 *FABP3*[18]。

LPL 能催化 TAG 分解为脂肪酸和甘油，为组织供能及贮存能量[19]。FABP3 与细胞内 LCFA 的转运有关，可将 LCFA 从细胞膜上运送到 TAG 和磷脂的合成位点[20]。赵艳丽等[21]研究表明，添加适宜浓度的蛋氨酸对 BMECs 内 *FABP*3 和 *LPL* 基因表达具有显著的促进作用，说明蛋氨酸可以促进 BMECs 内 LCFA 的摄取与转运。本研究结果得出，2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组 *FABP*3 基因表达量、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组 *LPL* 基因表达均显著高于 0.5 mmol/L 组，且二者均随着 Lys 浓度的增加呈显著和趋于显著的一次线性增加，说明 Lys 对 BMECs 内 LCFA 的摄取与转运可能具有一定的促进效果，提示 Lys 对乳脂肪合成的促进效果呈浓度依赖关系。

FASN 是一种多功能的酶系统，参与脂肪酸合成的整个过程，*FASN* 是奶牛乳脂肪酸从头合成过程中的关键基因[11]，泌乳期奶牛乳腺内 SMCFA（C4~C16）的合成受 *FASN* 编码的蛋白调控[22]。并且，FASN 催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 而生成 LCFA。**硬脂酰辅酶 A 去饱和酶**(SCD)是 $\Delta 9$ 去饱和酶中一种主要的酶，是细胞中单不饱和脂肪酸合成的限速酶[20]。Li 等[23]研究发现，添加不同比例的含 Lys 的必需氨基酸可上调 BMECs 内 *LPIN*1、*FASN* 和 *SCD* 的基因表达量。本试验结果表明，Lys 对 *FASN* 基因表达的促进效果呈显著的浓度依赖效应，尤以 2.0 mmol/L 组最高，显著高于 16.0 mmol/L 组；Lys 也促进 *SCD*1 基因表达，以 2.0、4.0 mmol/L 组显著高于其他组。这些研究结果部分地解释了 Lys 对乳脂肪合成具有促进效果的原因。

此外，GPAM、AGPAT6 和 LPIN1 参与催化 TAG 的合成[24]，是参与乳脂肪合成的关键酶。GPAM 催化脂酰辅酶 A 与甘油-3-磷酸的 sn-1 位点结合形成溶血磷脂酸；AGPAT6 催化第 2 个脂酰辅酶 A 与甘油-3-磷酸的 sn-2 位点结合形成磷脂酸；LPIN 能转移磷酸基团，将磷酸基团转变成二酰甘油。研究发现敲除了泌乳小鼠的 *AGPAT*6 基因后不能合成乳脂肪[25]。本研究结果发现，Lys 对 *GPAM* 和 *AGPAT*6 基因表达量的作用效果呈显著的浓度依赖效应，随着 Lys 浓度的增加抑制了它们的表达，*AGPAT*6 以 2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L 组显著低于 0.5、1.0 mmol/L 组，*GPAM* 以 16.0 mmol/L 组显著低于 0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L 组；同时，Lys 显著地促进了 *LPIN*1 基因表达，以 1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L 组较高。这些研究结果说明，高浓度的 Lys 抑制了乳脂肪合成相关基因的表达，进一步解释了 Lys 对乳脂肪合成的促进效果呈浓度依赖效应的原因。

BTN1A1 和 XDH 是调控脂滴形成的主要蛋白[26]。固醇调节元件结合蛋白（SREBP）是核转录因子家族成员之一，过氧化物酶体增殖物激活受体（PPAR）属于核激素受体家族中的配体激活受体，PPARγ 可调控 *SREBP*1 基因的表达，同时 *LPL* 和 *ACACA* 等是 *PPARγ* 的标靶基因[27]。Kadegowda 等[28]用 *PPARγ* 激活剂处理 BMECs 后发现，上调了 *ACACA*、*FASN*、*SREBF*1、*SCD* 和 *LPIN*1 基因的表达。本研究结果显示，*BTN1A*1 和 *XDH* 基因表达量均以 1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L 组较高；*PPARγ* 基因及蛋白表达量均以 2.0、4.0 mmol/L 组显著高于 0.5 和 8.0、16.0 mmol/L 组；*SREBP*1 基因表达量以 1.0、2.0、4.0 mmol/L 组较高，蛋白表达量以 1.0、2.0 mmol/L 组较高，进一步从转录因子和脂滴形成的角度解释了 Lys 对乳脂肪合成具有促进效果的原因。*FABP*3、*LPL*、*FASN*、*GPAM*、*AGPAT*6 等是 *PPARγ* 和 *SREBP*1 的靶基因，在本研究只对 PPARγ 和 SREBP1 的蛋白表达量进行了探讨研究，而对 FABP3、LPL、FASN、GPAM、AGPAT6 等蛋白表达量尚未开展研究，有必要今后继续研究探讨，以更好地阐明 Lys 对乳脂肪合成的影响机理。

生冉[29]研究指出，雷帕霉素抑制雷帕霉素靶蛋白（mTOR）信号通路后，*SREBP*1、*PPARγ*、*ACACA* 和 *SCD*1 的基因表达量显著下降；Soliman 等[30]的试验研究也得出了相似的结果，雷帕霉素抑制了人乳腺外植体中 *SREBP*1 及其靶基因 *ACACA*、*FASN* 和 *SCD*1 的基因表达，说明 mTOR 信号通路通过转录因子 SREBP1 和 PPARγ 调控乳脂肪的合成。Lys 是否通过 mTOR 信号通路间接地调控乳脂肪的合成尚未见资料报道，本试验并未对 mTOR 信号通路相关基因进行检测，需要进一步深入研究。

综合脂肪酸摄取与转运、从头合成、TAG 的合成及脂滴形成的相关基因表达结果可以看出，Lys 对 BMECs 内的乳脂肪合成具有一定的促进效果，呈浓度依赖效应，以 2.0~4.0 mmol/L 的 Lys 添加浓度为宜，且 Lys 对 BMECs 细胞活力的影响也呈显著浓度依赖效应。然而目前关于添加 Lys 对奶牛乳脂肪合成及其调控机理的研究甚少，并且本试验得出的结果还没有在体内进一步验证，因此，需要进一步深入研究。

4 结 论

① Lys 对 BMECs 的乳脂肪合成具有显著的促进效果，但高浓度的 Lys 抑制了乳脂肪合成相关基因的表达。

② 本试验条件下，培养基中 Lys 适宜浓度为 2.0~4.0 mmol/L。

参考文献：

[1] MAXIN G,RULQUIN H,GLASSER F.Response of milk fat concentration and yield to nutrient supply in dairy cows[J].Animal,2011,5(8):1299–1310.

[2] GIALLONGO F,HARPER M T,OH J,et al.Effects of rumen-protected methionine,lysine,and histidine on lactation performance of dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2016,99(6):4437–4452.

[3] XU Y T,ZENG Z K,XU X,et al.Effects of the standardized ileal digestible valine:lysine ratio on performance,milk composition and plasma indices of lactating sows[J].Animal Science Journal,2016,doi:10.1111/asj.12753.

[4] 韩慧娜.秸秆日粮条件下阴外动脉灌注乳脂和乳蛋白前体物对奶牛乳腺内短链脂肪酸摄取规律的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015.

[5] SHENG R,YAN S M,QI L Z,et al.Effect of the ratios of acetate and β-hydroxybutyrate on the expression of milk fat- and protein-related genes in bovine mammary epithelial cells[J].Czech Journal of Animal Science,2015,60(12):531–541.

[6] 李喜艳.奶牛乳腺上皮细胞中赖氨酸蛋氨酸配比模式对酪蛋白合成的影响及机理研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2011.

[7] 高海娜.亮氨酸、组氨酸、赖氨酸和蛋氨酸对奶牛乳腺上皮细胞中酪蛋白合成的影响及调控机理研究[D].硕士学位论文.兰州:甘肃农业大学,2016.

[8] RAMÍREZ-ZACARÍAS J,CASTRO-MUÑOZLEDO F,KURI-HARCUCH W,et al.Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O[J].Histochemistry,1992,97(6):493–497.

[9] ZHOU Y,AKER R M, JIANG H.Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells[J].Journal of Dairy Science,2008,91(1):100–108.

[10] QI L Z,YAN S M,SHENG R,et al.Effects of saturated long-chain fatty acid on mRNA expression of genes associated with milk fat and protein biosynthesis in bovine mammary epithelial cells[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2014,27(3):414–421.

[11] BIONAZ M,LOOR J J.Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle[J].BMC Genomics,2008,9:366.

[12] 张养东.脂多糖对泌乳奶牛乳脂肪和乳蛋白影响及其机理研究[D].博士学位论文.哈尔滨:东北农业大学,2011.

[13] HARVATINE K J,BOISCLAIR Y R,BAUMAN D E.Recent advances in the regulation of milk fat synthesis[J].Animal,2009,3(1):40–54.

[14] JENSEN R G.The composition of bovine milk lipids:January 1995 to December 2000[J].Journal of Dairy Science,2002,85(2):295–350.

[15] HARFOOT C G,HAZLEWOOD G P.Lipid metabolism in the rumen[M]//HOBSON P N,STEWART C S.The rumen microbial ecosystem.Netherlands:Springer,1997.

[16] SOLIMAN G A.The integral role of mTOR in lipid metabolism[J].Cell Cycle,2011,10(6):861–862.

[17] 李珊珊.必需氨基酸调节奶牛乳腺合成乳蛋白和乳脂肪的作用机制[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2015.

[18] LRHNER R,KUKSIS A.Biosynthesis of triacylglycerols[J].Progress in Lipid Research,1996,35(2):169–201.

[19] BONNET M,LEROUX C,CHILLIARD Y,et al.Rapid communication:nucleotide sequence of the ovine lipoprotein lipase cDNA[J].Journal of Animal Science,2000,78(11):2994–2995.

[20] 胡菡,王加启,李发弟,等.奶牛乳腺脂肪酸合成相关基因研究进展[J].生物技术通报 2009(10):34–39.

[21] 赵艳丽,陈璐,史彬林,等.亮氨酸对奶牛乳腺上皮细胞内乳脂合成相关基因和蛋白表达的影响[J].动物营养学报,2017,29(4):1319–1326.

[22] WAKIL S J.Fatty acid synthase,a proficient multifunctional enzyme[J].Biochemistry,1989,28(11):4523–4530.

[23] LI S S,HOSSEINI A,et al.Essential amino acid ratios and mTOR affect lipogenic gene networks and miRNA expression in bovine mammary epithelial cells[J].Journal of Animal Science and Biotechnology,2016,7:44.

[24] COLEMAN R A,LEE D P.Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation[J].Progress in Lipid Research,2004,43(2):134–176.

[25] BEIGNEUX A P,VERGNES L,QIAO X,et al.*AGPAT6*-a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium[J].Journal of Lipid Research,2006,47(4):734–744.

[26] MCMANAMAN J L,RUSSEL T D,SCHAACK J,et al.Molecular determinants of milk lipid secretion[J].Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia,2007,12(4):259–268.

[27] DESVERGNE B,MICHALIK L,WAHLI W.Transcriptional regulation of metabolism[J].Physiological Reviews,2006,86(2):465–514.

[28] KADEGOWDA A,BIONAZ M,PIPEROVA L,et al.Lipogenic gene expression in MAC-T cells is affected differently by fatty acids and enhanced by PPAR-gamma activation[J].Journal of Dairy Science,2008,91:678.

[29] 生冉.乙酸参与奶牛乳腺上皮细胞内乳脂肪和乳蛋白合成的调控机理研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015.

[30] SOLIMAN M,KIMURA K,AHMED M,et al.Inverse regulation of leptin mRNA expression by short- and long-chain fatty acids in cultured bovine adipocytes[J].Domestic Animal Endocrinology,2007,33(4):400–409.

Effects of Lysine on Expressions of Genes and Proteins Involved in Milk Fat Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells

CHEN Lu ZHAO Yanli GUO Xiaoyu SHI Binlin YAN Sumei*

(*Collage of Animal Science*, *Inner Mongolia Agriculture University*, *Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: This study was to detect the effects of lysine (Lys) on expressions of genes and proteins involved in milk fat synthesis in bovine mammary epithelial cells (BMECs) and discuss the mechanism of Lys regulating milk fat synthesis. The 3rd passage BMECs were divided into six groups with six replicates per group and one pore per replicate. Cells were cultured in medium containing 0.5 (basal medium, control), 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 16.0 mmol/L Lys, respectively. The

*Corresponding author, professor, E-mail: yansmimau@163.com

（责任编辑 王智航）

triglyceride (TAG) content, expressions of genes and proteins involved in milk fat synthesis were detected after 48 h cultivation at 37 ℃ and 5% CO_2. The results showed as follows: TAG content ($P=0.013$) and gene expressions of fatty acid-binding protein 3 (*FABP*3, $P=0.001$), lipoprotein lipase (*LPL*, $P=0.096$), fatty acid synthase (*FASN*, $P=0.003$), 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (*AGPAT*6, $P=0.038$) and glycerol-3-phosphate acyltrandferase (*GPAM*, $P=0.022$) acted dose-dependent on Lys at significant level or significant tendency. Compared with 0.5 mmol/L group, 2.0, 4.0, 8.0 and 16.0 mmol/L groups significantly increased gene expression of *FABP*3 ($P<0.05$), and 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 16.0 mmol/L groups significantly increased gene expression of *LPL* ($P<0.05$). Gene expression of *FASN* in 2.0 mmol/L group was the highest, which was significantly higher than that in 16.0 mmol/L group ($P<0.05$). Gene expression of stearoyl-CoA desaturase 1 (*SCD*1) in 2.0 to 4.0 mmol/L groups was significantly higher than that in other groups ($P<0.05$). Gene expressions of phosphatidic acid phosphatase 1 (*LPIN*1), butyrophilin subfamily 1 member A1 (*BTN*1*A*1) and xanthine dehydrogenase (*XDH*) in 1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 mmol/L groups were significantly higher than those in 0.5 mmol/L group. Compared with the 0.5, 8.0 and 16.0 mmol/L groups, 2.0 and 4.0 mmol/L groups significantly increased gene and protein expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (*PPARγ*) ($P<0.05$). Gene expression of sterol regulatory element binding protein 1 (*SREBP*1) in 1.0, 2.0 and 4.0 mmol/L groups was significantly higher than that in the other groups ($P<0.05$), and protein expression of *SREBP*1 in 1.0 mmol/L group was significantly higher than that in the other groups ($P<0.05$). High dose of Lys decreased gene expressions of *AGPAT*6 and *GPAM*. Compared with 0.5 and 1.0 mmol/L groups, 2.0, 4.0, 8.0 and 16.0 mmol/L groups significantly decreased gene expression of *AGPAT*6 ($P<0.05$). Compared with 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mmol/L groups, 16.0 mmol/L groups significantly decreased gene expression of *GPAM* ($P<0.05$). In conclusion, Lys significantly promote milk fat synthesis in BMECs, but high dose of Lys inhibits gene expressions related in milk fat synthesis. Under the conditions in the present study, 2.0 to 4.0 mmol/L of Lys is an optimal level in culture medium.

Key words: dairy cow; bovine mammary epithelial cells; lysine; milk fat